

RECOMENDAÇÃO TÉCNICAISSN 1413-9553
novembro, 1996

Número 01/96

**INSTRUMENTOS DESENVOLVIDOS NO CNPDIA
PARA CONGELAMENTO DE EMBRIÕES**Ladislau Marcelino Rabello
Paulo Estevão Cruvinel*Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária**Centro Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento de Instrumentação Agropecuária**Ministério da Agricultura e do Abastecimento**Rua XV de Novembro, 1452 - Caixa Postal 741 - CEP 13560-970 - São Carlos - SP**Telefone: (016) 274 2477 - Fax: (016) 272 5958*

RECOMENDAÇÃO TÉCNICA N° 1

ISSN 1413-9553

novembro, 1996

**INSTRUMENTOS DESENVOLVIDOS NO CNPDIA
PARA CONGELAMENTO DE EMBRIÕES**

Ladislau Marcelino Rabello

Paulo Estevão Cruvinel

INSTRUMENTOS DESENVOLVIDOS NO CNPDIA PARA CONGELAMENTO DE EMBRIÕES

Ladislau Marcelino Rabello¹

Paulo Estevão Cruvinel²

A técnica de congelamento de embriões é atualmente utilizado na agricultura de muitos países objetivando a escolha e separação de matrizes geneticamente superiores tão bem como a criação de bancos genéticos.

Esta técnica consiste basicamente na coleta, manipulação e critérios de congelamento de embriões, retirados de uma doadora que foi previamente ovulada e inseminada, para após ser condicionado em baixas temperaturas, como a do nitrogênio líquido.

Entretanto se os embriões fossem congelados em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta, sofreriam danos em sua camada externa devido a cristalização intracelular e nesse caso morreriam. Para resolver este tipo de problema existem vários procedimentos recomendados para o congelamento, além das técnicas de manuseio e preparação, abaixando a temperatura sem danificá-los. O protocolo mais usual, para o caso de embriões bovinos, Takeda (1984), é o abaixamento da temperatura, após a coleta, a partir da temperatura inicial ambiente, numa taxa inicial de 1°C/minuto até a temperatura de -5°C, estabilizando nesta por um determinado tempo, onde o operador executa a função denominada "seeding", que é a cristalização da substância crioprotetora que envolve o embrião em uma posição logo acima e abaixo do mesmo, com uma pinça mergulhada em nitrogênio líquido, como indicado na figura 1.

¹ Eng. Eletrônico, MSc, EMBRAPA-CNPEDIA, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

² Eng. Eletrônico, PhD, EMBRAPA-CNPEDIA, Caixa Postal 741, CEP 13560-970, São Carlos, SP

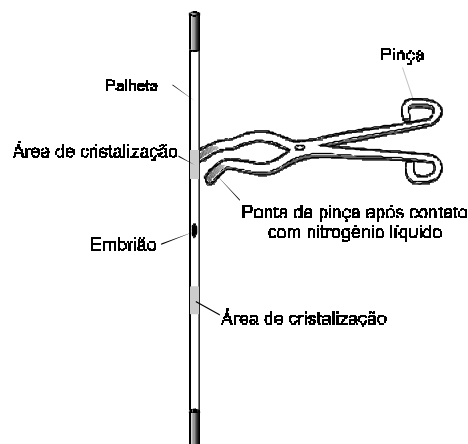


Figura 1: Processo de cristalização inicial da substância crioprotetora.

Após o preparo da amostra na temperatura de -5°C , inicia-se uma fase crítica que é o abaixamento da temperatura até -40°C . Crítica porque se deve abaixar a temperatura lentamente e com o mínimo de oscilações. É recomendado uma taxa de decaimento de $0,3^{\circ}\text{C}/\text{minutos}$, Takeda (1984) e Schneider (1984). Na figura 2 é ilustrado um exemplo da curva necessária para o congelamento de embriões bovinos.

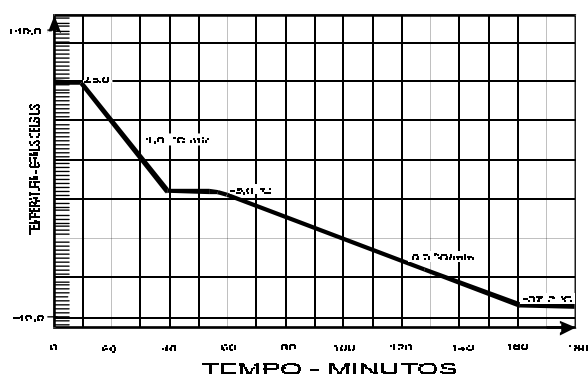


Figura 2: Ilustração das rampas de congelamento.

Uma série de equipamentos para congelamento de embriões podem ser encontradas, desde equipamentos manuais a sistemas automáticos os quais permitem a escolha de rampa de decaimento ou de incremento de temperaturas de acordo com a necessidade do operador.

Os equipamentos manuais mais simples consistem de uma garrafa de vidro, cujo interior é preenchido com solução de álcool, acetona e gelo, conforme ilustra a figura 3a. O controle de temperatura é feito colocando gelo seco em pedaços, proporcional ao degrau de temperatura que se quer ajustar. Este tipo de aparelho exige uma constante dedicação e observação do operador e a reprodução das rampas de resfriamento nunca é obtida.

Outra unidade manual, apresenta dois frascos, conforme figura 3b. O frasco menor é preenchido com álcool onde ficará a amostra a ser resfriada. Esta primeira garrafa é introduzida dentro de um segundo frasco maior, que contém nitrogênio líquido. As taxas de resfriamento ficam em função de parâmetros tais como, quantidade de álcool e profundidade do primeiro frasco dentro do nitrogênio líquido.

A terceira unidade, apresentada na figura 3c, consiste de um tanque de nitrogênio líquido, tendo montado na parte superior um cano largo formando um pescoço. A amostra é introduzida através do cano que fica envolto pelo vapor de nitrogênio. A temperatura decrescerá à medida que a amostra se aproxima da parte líquida do nitrogênio. Neste equipamento a taxa de resfriamento é função da velocidade que a amostra se desloca desde a entrada até a superfície do nitrogênio líquido.

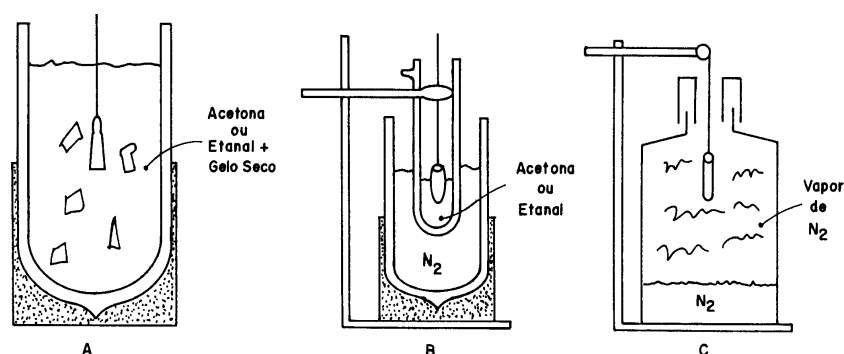


Figura 3: Exemplos de sistemas para o congelamento de embriões com procedimentos manuais.

Os equipamentos comerciais são em geral utilizados para embriões de espécies específicas. Não permitem grande flexibilidade na escolha das rampas de congelamento, utilizando ainda sistemas complexos, tal como, a constante injeção de nitrogênio líquido. Devido a estas limitações, geralmente possuem controles de temperatura dedicados e não permitem ao pesquisador buscar novas técnicas para congelamento de espécimes conhecidas ou em extinção.

A automação de sistemas de congelamento de embriões é uma prática que vem sendo utilizada a alguns anos por países como os Estados Unidos e a França e vem a otimizar o erros dos procedimentos manuais, principalmente garantindo uma mínima taxa de sobrevivência de embriões após o descongelamento.

Entretanto têm-se observado que os equipamentos disponíveis comercialmente são em geral dedicados atendendo a protocolos de congelamento com número de rampas pré-programadas, limitando ações de pesquisa.

A EMBRAPA-CNPDIA desenvolveu inicialmente uma versão de sistema de congelamento automatizado com o uso de microcontrolador, Cruvinel (1992). Ilustrado na figura 4.

Com o objetivo de se obter um instrumento que venha possibilitar ações de pesquisa nos protocolos de congelamento de diferentes espécimes a EMBRAPA-CNPDIA desenvolveu o sistema de congelamento computadorizado o qual permite o controle de temperatura entre -40°C a $+40^{\circ}\text{C}$, bastante flexível nesta faixa com dimensões compactas, permitindo a escolha das rampas conforme a necessidade do operador, dentro da faixa, para decréscimo de temperatura, de $2,0^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$ a $0,1^{\circ}\text{C}/\text{minuto}$.



Figura 4 : Sistema de congelamento automatizado

A figura 5 ilustra o diagrama de bloco do sistema computadorizado para congelamento de embriões. Como se pode observar o sistema utiliza gás refrigerante em substituição ao nitrogênio líquido, que como já mencionado, normalmente se perde na atmosfera. O sistema de refrigeração é composto de evaporador, compressor, condensador e tubo capilar. O evaporador consiste de dois cilindros de aço inox, com aletas entres as paredes, em forma helicoidal, o que permite que o gás em sua expansão possa ter uma área maior de contato. Uma camada de poliuretano envolve o evaporador para isola-lo do meio ambiente.

O gás refrigerante utilizado foi o R-502, de alta capacidade de produção de frio, tendo uma temperatura de evaporação de -45°C.

Dentro do evaporador, na câmara de congelamento dos embriões, com a finalidade de aquecer a câmara para anular a constante ação do frio, controlando a temperatura na faixa desejada, utilizou-se uma resistência elétrica de forma helicoidal. A temperatura da câmara é lida por meio de um sensor termo-resistivo. O bloco indicado por sistema de potência atua como interface de controle, recebendo um sinal do computador e convertendo-o a um nível adequado de energia para a resistência no ato de controle de temperatura. O controle e a programação de protocolos de congelamento são realizados pelo acoplamento de um computador PC compatível.

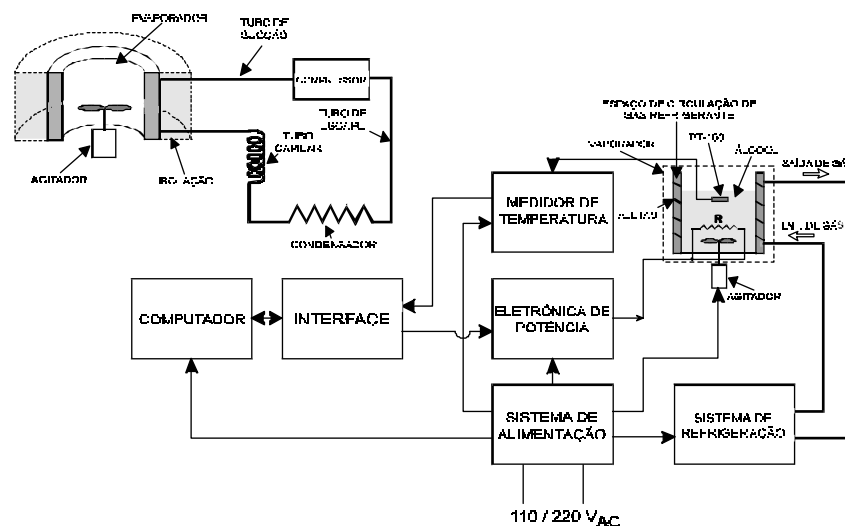


Figura 5: diagrama de bloco do sistema computadorizado para congelamento de embriões

A figura 6, ilustra o sistema de congelamento de embriões computadorizado desenvolvido na EMBRAPA-CNPDIA.



Figura 6: Sistema computadorizado para congelamento de embriões desenvolvido na EMBRAPA-CNPDIA.

Esse sistema apresenta flexibilidade na programação para ajudar no processo de controle de congelamento de embriões. Flexibilidade, quando comparada à de outros equipamentos, possibilita a operacionalidade automática tanto para protocolos conhecidos para o congelamento de embriões como para novos, viabilizando assim as ações de pesquisas.

Resultados sem o uso direto pelos produtores, mas de interesse da pesquisa, mostram o estudo e o projeto de um sistema versátil para o congelamento de embriões, com flexibilidade de programações e a otimização de desenho mecânico para um congelador de embriões. Resultados de uso direto pelos produtores mostraram a possibilidade da conservação de embriões por tempo praticamente não-limitado, a não necessidade de sincronização entre as doadoras e receptoras de embriões, a escolha da data do parto, a possibilidade do transporte de embriões a longas distâncias e o desenvolvimento de tecnologia nacional nessa área.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- CRUVINEL, P.E.; RABELLO, L.M.; BERTUCCI NETO, V.; BEM, A.R.; CASAGRANDE, J.F.; ALMEIDA, C.A.; QUEIROZ, F.H. Sistema programado para o congelamento de embriões. In: ENCONTRO NACIONAL DE FÍSICA DA MATÉRIA CONDENSADA, 16, Caxambu-MG, maio 1993. **Resumos estendidos do Grupo de Instrumentação...** São Paulo: Sociedade Brasileira de Física, 1993. p.64-67.
- RABELLO, L.M. **Sistema computadorizado para congelamento de embriões.** São Carlos: USP-EESC, 1993. 226p. Tese Mestrado
- RABELLO, L.M.; CRUVINEL, P.E.; BERTUCCI NETO, V. A automação de um sistema para o congelamento de embriões. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE AUTOMÁTICA, 10 E CONGRESSO LATINO-AMERICANO DE CONTROLE AUTOMÁTICO, 6, Rio de Janeiro-RJ, set. 1994. **Anais...** Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Automática, 1994. v.1, p.454-458
- CRUVINEL, P.E. et al. coordenador Sistema programado para congelamento de embriões, resumo do relatório: São Carlos-SP, EMBRAPA-NPDIA, 1992 36p. **Projeto nº 801.87.009/7** concluído.
- TAKEDA, T. Equipament for cooling embryos. In: **Techniques for freezing mammlaian embryos.** Colorado : Embryos Transfer Laboratory Animal Reproduction, Colorado State University p.51-55. 1984.
- SCHNEIDER, U.; MAZUR, P. Osmotic consequences of cryoprotectant permeability and its relation to the survival of frozenthawed embryos. **Theriogenology**, v.21, n.1,p.68-79, 1984.